

DIE ANLAGERUNG
VON HEPARIN AN GRANULOZYTEN
ALS AUSDRUCK EINER INTAKTEN
ZELLMEMBRAN

Irena Kuszlik



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0133

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. H. Spiess

DIE ANLAGERUNG VON HEPARIN AN GRANULOZYTEN

ALS AUSDRUCK EINER INTAKTEN ZELLMEMBRAN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Irena Kuszlik

aus

Lingen/Ems

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1986

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. Bedeutung der Granulozyten bei Entzündl. Erkrankungen	1
2. Problemstellung	2
3. Ziel der Arbeit	3
II. HAUPTTEIL	4
1. Material und Methodik	4
1.1. Beschreibung der Methode	4
2. Untersuchte Personen	5
2.1. Aufteilung nach Erkrankungen	5
2.2. Alter und Geschlecht	5
2.3. Kontrolluntersuchungen	5
2.4. Rheumatypen	6
2.4.1. Systemische Form	6
2.4.2. Seropos. Form	6
2.4.3. Seroneg. Form	7
2.4.4. Oligoarthritis I	7
2.4.5. Oligoarthritis II	8
3. Untersuchungen u. Ergebnisse	8
3.1. Tabellen (1 - 7)	9
3.2. Statistische Auswertung (Tabelle 8 - 11)	15
3.3. Analyse der Ergebnisse	16
3.3.1. Prüfung der Nor- malverteilung	16
3.3.2. Prüfung der Sig- nifikanz	17

3.3.3. Untersuchung der	
Ergebnisse auf	
geschlechtsspezif.	
Unterschiede	17
3.4. Graphische Darstellung	
(Abb. 1 - 4)	19
3.5. Bildmaterial	23
III. DISKUSSION	24
IV. ZUSAMMENFASSUNG	31
V. LITERATURVERZEICHNIS	33
LEBENS LAUF	40

I. EINLEITUNG

1. Bedeutung der Granulozyten bei entzündlichen Erkrankungen

Die Leukozytenzahl ist physiologischen Schwankungen unterworfen und wird besonders stark durch die körperliche Aktivität beeinflusst. Dabei handelt es sich besonders um eine Verschiebung der neutrophilen Granulozyten aus den Randpartien der Gefäße und aus dem Knochenmark ins zirkulierende Blut. Die Übergänge von den physiologischen Schwankungen der Leukozyten zu pathologisch-reaktiven Veränderungen des weißen Blutbildes sind fließend (9).

Akute bakterielle Infekte führen zu charakteristischen Veränderungen der Blutzellen und der Serumproteine. Sie sind mit ihren drei Phasen unter dem Begriff der "biologischen Leukozytenkurve" zusammengefaßt: Neutrophile (Kampfphase), Monozytäre (Abwehr- und Überwindungsphase), Eosinophil-Lymphozytäre (Heil-) Phase. Der akute bakterielle Infekt ist durch die Trias Leukozytose, Linksverschiebung und Toxische Granulation gekennzeichnet (7).

Die Linksverschiebung ist die relative Zunahme der jüngeren (d.h. in den schematischen Darstellungen links stehenden) myeloischen Elemente. Sie reicht normalerweise über eine größere Anzahl von Stabkernigen (normal: unter 5 %) und einigen Jugendlichen (Metamyelozyten, normal: unter 2 %) nicht hinaus (7).

Unter Toxischer Granulation versteht man, daß bei panoptischer Färbung nach Pappenheim statt der feinen rötlich tingierten Granula der Neutrophilen gröbere, rotbraun bis blauviolett gefärbte Granula auftreten, wie es z.B. bei Scharlach der Fall ist (7).

Die Leukozytose kommt physiologisch beim Neugeborenen, in der Schwangerschaft, bei körperlicher Anstrengung, Durst und Sonnenbestrahlung vor (9).

Der größte Teil der bakteriellen Infekte löst eine spezifische neutrophile Leukozytose aus. Dies ist der erste Ausdruck des sofort einsetzenden Abwehrmechanismus. Unspezifische neutrophile Leukozytosen beobachtet man bei schweren Intoxikationen, Coma diabetikum und -urämicum usw. Der Abfall der absoluten Granulozytenzahl, die Leukopenie, ist entweder Ausdruck einer verminderten Ausschwemmung aus dem Knochenmark oder einer beschleunigten Zerstörung in der Blutbahn. Typhus, M. Bang, Virusinfektionen, Intoxikationen wie ionisierende Strahlen, Knochenmarkserkrankungen und hormonelle Störungen haben die Leukopenie zur Folge (1).

2. Problemstellung

In der Kinderpoliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde eine fluoreszenzmikroskopische Methode entwickelt, mit deren Hilfe die Unversehrtheit oder Schädigung von Zellmembranen beobachtet werden kann. Das Prinzip der Methode - auf welches später eingegangen wird - ist es, vitale Zellen mit Heparin zu inkubieren, welches sich als Polyanion an die positiv geladenen Oberflächenanteile der Zellmembran elektrostatisch bindet. Ist die Zellmembran geschädigt, so bricht das Membranpotential zusammen und Heparin wird nicht mehr an die Zelloberfläche angelagert.

Für diese Methode wurden erst Normalwerte erstellt, und diese dann Probanden (Kinder, Jugendliche und Erwachsene) mit Entzündlich Rheumatischen Erkrankungen gegenübergestellt.

3. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, eine mögliche Beziehung zwischen der Anzahl der defekten Granulozyten und der Krankheitsaktivität sowie den üblichen Entzündungsparametern (Leukozytenzahl, Linksverschiebung) herzustellen.

II. HAUPTTEIL

1. Material und Methodik

1.1. Beschreibung der Methode

Venös entnommenes Blut wird in EDTA-Gefäße überführt und innerhalb von 30 Minuten wie folgt verarbeitet: 50 µl EDTA-Blut werden 50 µl Barbital-Na/HCl-Puffer (0,1 n, pH 7) zugesetzt. Anschließend werden 2 µl Heparin-Natrium (Braun) = 10 I.E. zugegeben und die Probe geschüttelt. Anfertigen von Blutaussstrichen. Nach sorgfältigem Trocknen der Ausstriche werden diese mit einer 0,4 %igen 9-Aminoacridinhydrochlorid-Lösung (Merck) 20 Minuten gefärbt. Der Farbstoff wird in 50 %igem Äthanol gelöst. Die Objektträger werden mit 70 %igem Äthanol abgespült und erneut getrocknet. Zur besseren Kontrastierung erfolgt eine Anfärbung mit einer $5 \times 10^{-4}M$ -Pseudoisocyaninchloridlösung. Nach 1 Minute Entfernen des Farbstoffes und Trocknen der Ausstriche. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop "Ortholux II" (Leitz) mit dem Ölimmersionsobjekt 100/1.30. Die Präparate werden in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon-Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit dem Blauerregerfilter BG 12 (Leitz) und dem Sperrfilter TK 510 (Leitz) untersucht. Die photographischen Aufnahmen erfolgen mit Ectachrome Highspeed (Tageslicht). Die Belichtungszeit beträgt 5 - 12 Sekunden.

2. Untersuchte Personen

2.1. Aufteilung nach Erkrankungen

Insgesamt wurden 98 Kinder, Jugendliche und Erwachsene untersucht: 50 Gesunde (keine Entzündlichen Erkrankungen)
48 Erkrankte (Entzündliche Erkrankungen)

Die Gruppe der entzündlich Erkrankten teilt sich auf in:

- 8 Patienten mit Oligoarthrititis I und II
- 21 Patienten mit Seronegativer Polyarthrititis
- 3 Patienten mit Systemischer und Seropositiver Juveniler Chronischer Arthritis
- 16 Patienten mit sonstigen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, z.B. M. Behçet, Monarthrititis etc.

2.2. Alter und Geschlecht

Das Alter der Probanden betrug zwischen 4 Monaten und 49 Jahren. Die Geschlechtsverteilung war wie folgt:

- Gesunde: 27 W / 23 M
- Oligoarthrititis I und II: 4 W / 4 M
- Seronegative Polyarthrititis: 16 W / 5 M
- System. u. Seroposit. JCA: 1 W / 2 M
- Sonstige Entzündl.-Rheumat. Erkrankungen: 11 W / 5 M

2.3. Kontrolluntersuchungen

Zur Kontrolle der beiden Patientengruppen (keine Entzündlichen Erkrankungen/Entzündliche Erkrankungen) wurden zusätzlich die Blutsenkungsgeschwindigkeit, die Leukozyten (aufgeteilt nach defekten, reifen, unreifen Granulozyten und Gesamtzahl der Leukozyten) und das Differentialblutbild untersucht.

2.4. Rheumatypen

2.4.1. Systemische Form (Still'sche Krankheit)

Die Systemische Form tritt bevorzugt im Kleinkindalter auf, wobei die Geschlechtsdisposition gleichmäßig verteilt ist.

Als Symptome sind besonders das charakteristische, hohe, intermittierende "septische" Fieber mit abendlichen Temperaturen bis 40 Grad Celsius und normalen Temperaturen am Morgen zu nennen. Mit dem Ansteigen der Temperatur erscheint ein makulopapulöses lachsfarbenes flüchtiges Exanthem. Weitere Befunde und Symptome: Hepatosplenomegalie, Abdominalschmerz, Lymphadenopathie, Polyserositis, Myokarditis, Leukozytose, Anämie, Thrombozytose und Gewichtsverlust. Der Gelenkbefall ist zu ca. 60 % polyartikulär und zu ca. 40 % pauciartikulär. Die Blutsenkung ist massiv erhöht, der IgM-Rheumafaktor negativ. Antinukleäre Antikörper sind ebenfalls negativ, eine Iridozyklitis selten. Ankylosierende Veränderungen an der Halswirbelsäule gelten als pathognomonisch. Beim Erwachsenen finden sich besonders häufig bei langdauerndem Krankheitsverlauf die schweren destruierenden Veränderungen im Bereich der Hüft- und Schultergelenke (29, 30).

2.4.2. Seropositive Form

Die Häufigkeit der Erkrankung wird mit 5 - 10 % angegeben. Die Altersdisposition liegt bei Beginn der Pubertät, es werden mehr Mädchen als Jungen befallen. Der Verlauf ist persistierend, häufig und rasch destruierend; leichtere Allgemeinsymptome sind möglich. Befallen werden die oberen und unteren Extremitäten, die großen und kleinen Gelenke in

symmetrischer Anordnung. Der Lumbosakral-Bereich ist frei. Der IgM-Rheumafaktor ist positiv (100 %), die Antinukleären Antikörper ebenso (50 - 70 %). Eine Iridozyklitis tritt nicht auf (29, 30).

2.4.3. Seronegative Form

Das Auftreten dieser Erkrankung ist auf kein bestimmtes Kindesalter beschränkt, sondern tritt in der gesamten Kindheit auf. Die Häufigkeit liegt höher (30 - 40 %) als bei der Seropositiven (5 - 10 %). Die Allgemeinsymptome und der Gelenkbefall sind bei beiden Formen gleich. Allerdings findet sich bei der Seronegativen kein Rheumafaktor, und die Antinukleären Antikörper liegen etwas niedriger (20 - 40 %) als bei der Seropositiven (50 - 70 %). In seltenen Fällen ist eine Iridozyklitis vorzufinden. Allgemein ist zu sagen, daß die Prognose besser ist als bei der Seropositiven Form, sogar ein Stillstand ist möglich (29, 30).

2.4.4. Oligoarthritis Typ I

Diese Form tritt fast nur bei Mädchen auf, und zwar im Kleinkindalter, die Häufigkeit beträgt ca. 25 - 30 %. Allgemeinsymptome sind selten. Beteiligt sind nur ein bis vier größere Gelenke, insbesondere das Kniegelenk. Der Rheumafaktor ist negativ, die Antinukleären Antikörper sind positiv (60 - 80 %). Bei bis zu 50 % tritt eine chronische Iridozyklitis auf, die infolge einer Cataracta complicata und eines sekundären Glaukoms zur Erblindung führen kann (29, 30).

2.4.5. Oligoarthritis Typ II

Die Oligoarthritis Typ II wird auch als Sakroiliitis-Typ bezeichnet. Die Disposition liegt im späteren Schulalter (ab ca. 10 Jahren) und trifft fast nur Jungen. Ein Beginn als Reiter-Syndrom (Trias: Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis) ist möglich. Befallen werden hauptsächlich die großen Gelenke in asymmetrischer Anordnung, vor allen Dingen die der unteren Extremitäten (Hüftgürtel). Rheumafaktor und Antinukleäre Antikörper sind negativ, es findet sich aber das HLA-B-27. Eine Iridozyklitis tritt in 15 - 25 % auf, überwiegend akut. Eine familiäre Belastung zeigt sich in ca. 25 %. Der Übergang in die juvenile Spondylarthritis, später in die Spondylitis ankylosans (Bechterew) ist möglich (29, 30).

3. Untersuchungen und Ergebnisse

Untersucht wurde der Anteil der defekten Granulozyten in Prozent. Sie wurden, nach Krankheiten unterteilt, statistisch dargestellt. Der Mittelwert bei Gesunden liegt bei 5 defekten Granulozyten, Werte über 10 gelten als pathologisch. Die Spannweite reicht von 0 - 11 %. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit, die Leukozytenzahl und die Zahl der reifen und unreifen Granulozyten wurden mitbestimmt. Nachdem keine Korrelation zwischen der Zahl der defekten Granulozyten und den oben erwähnten Parametern (mit Ausnahme der unspezifischen Blutsenkungsgeschwindigkeit) nachweisbar war, wird im folgenden nicht mehr darauf eingegangen.

3.1. Tabelle 1: Gesunde

Alter Krankh. Therapie BKS Leukoz.Unr.G.Reife G.Def.G.

12	J	w	--	--	4	6 000	1	49	4
17	m	--	--	--	8	4 600	1	59	8
11	w	--	--	--	12	6 000	2	39	4
14	m	--	--	--	3	7 500	2	60	3
17	w	--	--	--	5	7 600	3	54	5
11	w	--	--	--	4	7 700	2	52	2
10	m	--	--	--	1	6 500	0	57	10
9	m	--	--	--	20	8 100	0	56	4
16	w	--	--	--	18	9 000	0	61	8
49	m	--	--	--	1	5 600	0	71	4
28	m	--	--	--	10	5 700	0	57	5
32	w	--	--	--	3	9 000	6	56	10
10	w	--	--	--	7	5 400	1	31	8
34	m	--	--	--	15	5 500	1	55	0
16	w	--	--	--	12	5 000	3	55	4
10	m	--	--	--	7	6 300	0	71	1
6	m	--	--	--	5	8 000	3	69	2
11	w	--	--	--	4	8 300	2	62	6
8	w	--	--	--	4	5 600	5	44	2
2	w	--	--	--	11	8 000	2	40	6
1	m	--	--	--	8	11 500	0	37	9
9	w	--	--	--	7	7 100	4	31	7
6	w	--	--	--	3	6 400	6	29	5
14	J	w	--	--	4	5 500	1	49	4
8	m	--	--	--	15	9 600	7	70	3
1	m	--	--	--	8	11 500	0	33	9
12	m	--	--	--	15	4 200	2	63	8
9	w	--	--	--	7	7 100	0	39	11
11	w	--	--	--	5	5 400	2	55	3

Fortsetzung Tabelle 1: Seite 10

Fortsetzung Tabelle 1: Gesunde

Alter Krankh. Therapie BKS Leukoz.Unr.G.Reife G.Def.G.

17	w	--	--	15	7 500	4	63	4
17	w	--	--	2	7 700	7	63	2
4Mo	m	--	--	3	8, 300	2	16	5
16 J	m	--	--	5	5 000	3	53	3
4	m	--	--	6	5 300	2	49	2
12	w	--	--	8	6 200	6	38	4
17	w	--	--	10	6 500	4	70	8
20	w	--	--	4	5 600	6	47	6
6	m	--	--	12	7 300	4	29	9
16	w	--	--	2	6 600	2	40	4
25	m	--	--	2	7 400	15	57	6
14	m	--	--	5	14 900	6	80	8
18	w	--	--	20	4 600	3	62	6
10	m	--	--	3	6 000	0	40	5
5	m	--	--	17	9 700	7	62	8
11	m	--	--	4	6 300	12	50	6
16	m	--	--	12	5 300	16	29	4
15	w	--	--	9	7 700	3	52	6
14	w	--	--	15	6 000	0	47	9
16	w	--	--	13	8 600	8	43	4
9	w	--	--	10	5 900	2	40	10

Leukoz. = Leukozyten, Unr. = Unreife, G. = Granulozyten
 Def. = Defekte, J = Jahre, Mo = Monate, w = weiblich,
 m = männlich

Tabelle 2: Seropositive JCA

Alter	Krankh.	Therapie	BKS	Leukoz.	Unr.G.	Reife	G.Def.G.
-------	---------	----------	-----	---------	--------	-------	----------

15 J m	JCA	ja	17	6 200	0	59	7
15 w	JCA	ja	58	4 700	1	80	34

Tabelle 3: Systemische JCA

Alter	Krankh.	Therapie	BKS	Leukoz.	Unr.G.	Reife	G.Def.G.
-------	---------	----------	-----	---------	--------	-------	----------

8 J m	Sys.JCA	ja	25	12 000	12	65	19
-------	---------	----	----	--------	----	----	----

Tabelle 4: Seronegative JCA

Alter	Krankh.	Therapie	BKS	Leukoz.	Unr.G.	Reife	G.Def.G.
-------	---------	----------	-----	---------	--------	-------	----------

4 J w	-JCA	--	8	12 200	0	23	25
7 m	"	--	17	9 700	0	20	23
10 w	"	--	11	11 700	3	52	26
12 w	"	--	8	6 700	7	51	18
6 m	"	--	23	10 600	3	49	46
8 m	"	--	26	6 600	6	46	44
24 w	"	ja	36	15 200	18	73	3
15 w	"	ja	33	4 500	10	65	10
3 w	"	ja	21	5 300	0	44	17
12 w	"	ja	5	7 900	1	68	9

Fortsetzung Tabelle 4: Seite 12

Fortsetzung Tabelle 4: Seronegative JCA

Alter Krankh. Therapie BKS Leukoz.Unr.G.Reife G.Def.G.

16	J	w	-JCA	ja	3	7	300	2	62	1
3	w	"		ja	30	8	600	4	53	38
16	m	"		ja	20	6	500	4	57	32
10	w	"		ja	35	9	000	13	78	24
6	m	"		ja	23	10	600	3	49	9
18	w	"		ja	54	7	500	3	54	5
19	w	"		ja	11	5	600	9	55	9
15	w	"		ja	22	3	700	13	56	9
12	w	"		ja	30	8	300	2	67	9
10	w	"		ja	30	7	300	3	57	19
13	w	"		ja	1	6	500	0	55	3

Sys.JCA = Systemische Juvenile Chronische Arthritis,

-JCA = Seronegative Juvenile Chronische Arthritis

Tabelle 5: Oligoarthritis Typ I

Alter Krankh. Therapie BKS Leukoz.Unr.G.Reife G.Def.G.

8	J	w	Typ I	ja	30	8	900	12	66	17
11	w	"		ja	28	3	100	13	36	21
13	w	"		ja	10	6	300	1	59	2
9	w	"		ja	36	11	700	3	69	12

Tabelle 6: Oligoarthritis Typ II

Alter Krankh. Therapie BKS Leukozyt. Unr.G. Reife G. Def.G.

18	J	m	Typ II	ja	35	8	300	4	62	8
16	m		"	--	4	6	100	3	51	14
9	m		"	--	32	10	200	2	51	37
15	m		"	--	22	5	600	10	50	4

Tabelle 7: Andere Entzündliche Erkrankungen

Alter Krankh. Therapie BKS Leukozyt. Unr.G. Reife G. Def.G.

10	J	w	ja	ja	13	7	500	2	54	6
15	w		ja	ja	65	7	600	3	58	47
17	m		ja	ja	18	4	600	1	59	8
20	w		ja	ja	47	9	300	5	74	8
3	w		ja	ja	14	6	200	3	50	9
9 Mo	w		ja	ja	35	13	200	4	70	25
9	J	w	ja	--	43	6	800	23	26	2
9	m		ja	--	4	7	300	2	58	12
45	w		ja	--	6	5	000	6	42	18
9	w		ja	--	4	5	100	2	47	46
10	w		ja	--	50	11	200	11	60	15
2	w		ja	--	28	8	800	10	32	8
15	m		ja	--	8	6	400	0	50	7
11	w		ja	--	5	6	400	0	46	9
3	m		ja	--	11	5	000	2	39	15
7	m		ja	--	7	7	400	2	50	15

Die Diagnosen bei den anderen Entzündlichen Erkrankungen (Tabelle 7) waren: Benigne Rheumaknoten, Reaktive Arthritis, Monarthritis, Chronische Polyarthritis, Coxitis, MCTD, M. Behçet, Purpura hypergammaglobulinaemica Waldenström und die Subsepsis allergica Wissler.

Die Therapie bestand aus folgenden Medikamenten:

Oligoarthritis Typ I:	Kortikosteroide, Acetylsalicylsäure, Diclofenac, u.a.
Oligoarthritis Typ II:	Piroxicam
Seronegative JCA:	Kortikosteroide, Aurano-fin, Diclo- fenac, Ridaura, Indometacin, u.a.
Seropositive JCA:	Indometacin, Azathioprim, u.a.
Systemische JCA:	Kortikosteroide, Azathioprim, Diclofenac
Andere Entz.Rheumat. Erkrankungen:	Diclofenac, Colchizin, Chloroquin, Acetylsalicylsäure, u.a.

3.2. Statistische Auswertung

Tabelle 8: Behandelte

	Oligoarthr. I u. II	-JCA	Syst.u. +JCA
Mittelwert	15,33	13,33	20
Spannweite	9 - 21	1 - 38	7 - 34
Stand.abw.	6,66	10,88	13,53
Varianz	44,33	118,26	183
Gesamtsumme			
d. Werte (Def.G)	46	197	60

-/+JCA = Seronegative/Seropositive Juvenile Chronische Arthritis

Stand.abw. = Standardabweichung

Def.G = Defekte Granulozyten

Tabell 9: Unbehandelte

	Oligoarthr. I u. II.	-JCA	Syst.u. +JCA
Mittelwert	13,8	30,33	--
Spannweite	2 - 37	18 - 46	--
Stand.abw.	13,94	11,71	--
Varianz	194,2	137,0	--
Gesamtsumme			
d. Werte (Def.G)	69	182	--

Tabelle 10: Andere Entz. Erkrankungen behandelt/unbehandelt

	Behandelt	Unbehandelt

Mittelwert	17,17	14,7
Spannweite	6 - 47	2 - 46
Stand.abw.	16,19	12,0
Varianz	262,1	144,0
Gesamtsumme		
d.Werte (Def.G)	103	147

Tabelle 11: Gesunde (n = 50) und Kranke (n = 48)

	Gesunde	Kranke

Mittelwert	5,48	16,75
Spannweite	0 - 11	1 - 47
Stand.abw.	2,67	12,74
Varianz	7,15	162,36
Gesamtsumme		
d.Werte (Def.G)	274	804

3.3. Analyse der Ergebnisse

3.3.1. Prüfung auf Normalverteilung

Der Vergleich des Mittelwerts ($\bar{x}$) mit der Standardabweichung (s) erlaubt eine grobe Prüfung der gemessenen Werte auf ihre Normalverteilung.

Normalverteilung kann angenommen werden, wenn ein Drittel des Mittelwertes größer als die Standardabweichung ist. Bei dieser Untersuchung ist weder bei der Oligoarthrititis Typ I und II, der Seronegativen JCA, der Systemischen und Seropositiven JCA noch bei den anderen Entzündlichen Erkrankungen eine Normalverteilung zu beobachten.

3.3.2. Prüfung der Signifikanz

Die Signifikanz (P) besagt laut Wilcoxon-Mann-Whithney-U-Test für Granulozyten im Vergleich

Gesunde : Kranke = $P < 0,0001$.

Für die BKS im Vergleich

Gesunde : Kranke = $P < 0,0001$.

P = die Probability. Ab 0,05 gilt sie als signifikant.

Die Ergebnisse sind also höchstsignifikant.

Der Mittelwert der defekten Granulozyten der Testpersonen (Kranke insgesamt) ist gegenüber der Kontrollgruppe (Gesunde) erhöht.

3.3.3. Untersuchung der Ergebnisse auf geschlechtsspezifische Unterschiede

	Gesunde (n = 50) männlich	weiblich
--	---------------------------	----------

Probandenzahl	23	27
Mittelwert		
(Def.G)	5,30	5,62

Kranke insgesamt (n = 48) männlich weiblich

Patientenzahl	16	32
Mittelwert (Def.G)	18,75	15,75

Mittelwert (def.G) bei der Aufteilung

nach Krankheit (n = 48) männlich weiblich

Patientenzahl	16	32
Oligoarthrititis I	--	13
Oligoarthrititis II	15,75	--
Seronegative JCA	30,8	14,06
System.u.Seropos.JCA	13	34
Andere Entz.Rheumat.Erkr.	11,4	17,54

Bei der Kontrollgruppe (Gesunde) ist die Geschlechts- und die Mittelwertverteilung der defekten Granulozyten in etwa gleich. Bei den Erkrankten fällt der hohe Mittelwert der defekten Granulozyten bei den männlichen Probanden mit Seronegativer JCA auf. Ansonsten liegt der Schwerpunkt bei den weiblichen Testpersonen. Teilweise ist die Anzahl der Probanden zu gering, um eine definitive Aussage zu den einzelnen Erkrankungen zu machen.

3.4. Graphische Darstellung

Abb. 1: Prozentualer Anteil defekter Granulozyten bei
Gesunden und Kranken insgesamt
Mittelwerte und Standardabweichungen

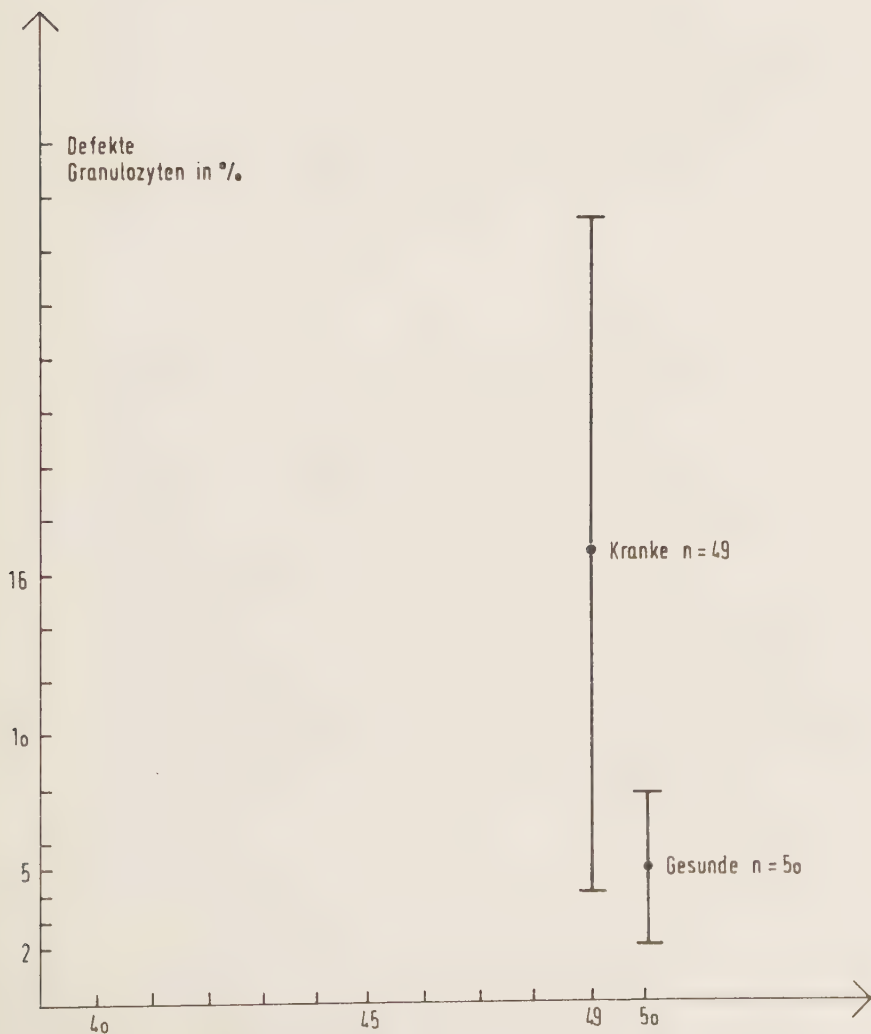


Abb. 2: Prozentualer Anteil defekter Granulozyten bei Behandelten und Unbehandelten mit Oligoarthritis I und II
Mittelwerte und Standardabweichungen

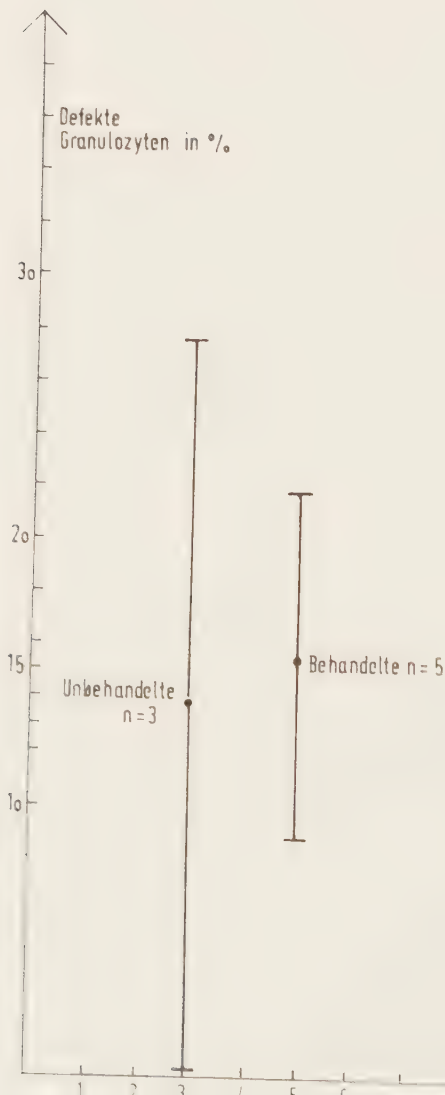


Abb. 3: Prozentualer Anteil defekter Granulozyten bei Behandelten und Unbehandelten mit Seronegativer JCA
Mittelwerte und Standardabweichungen

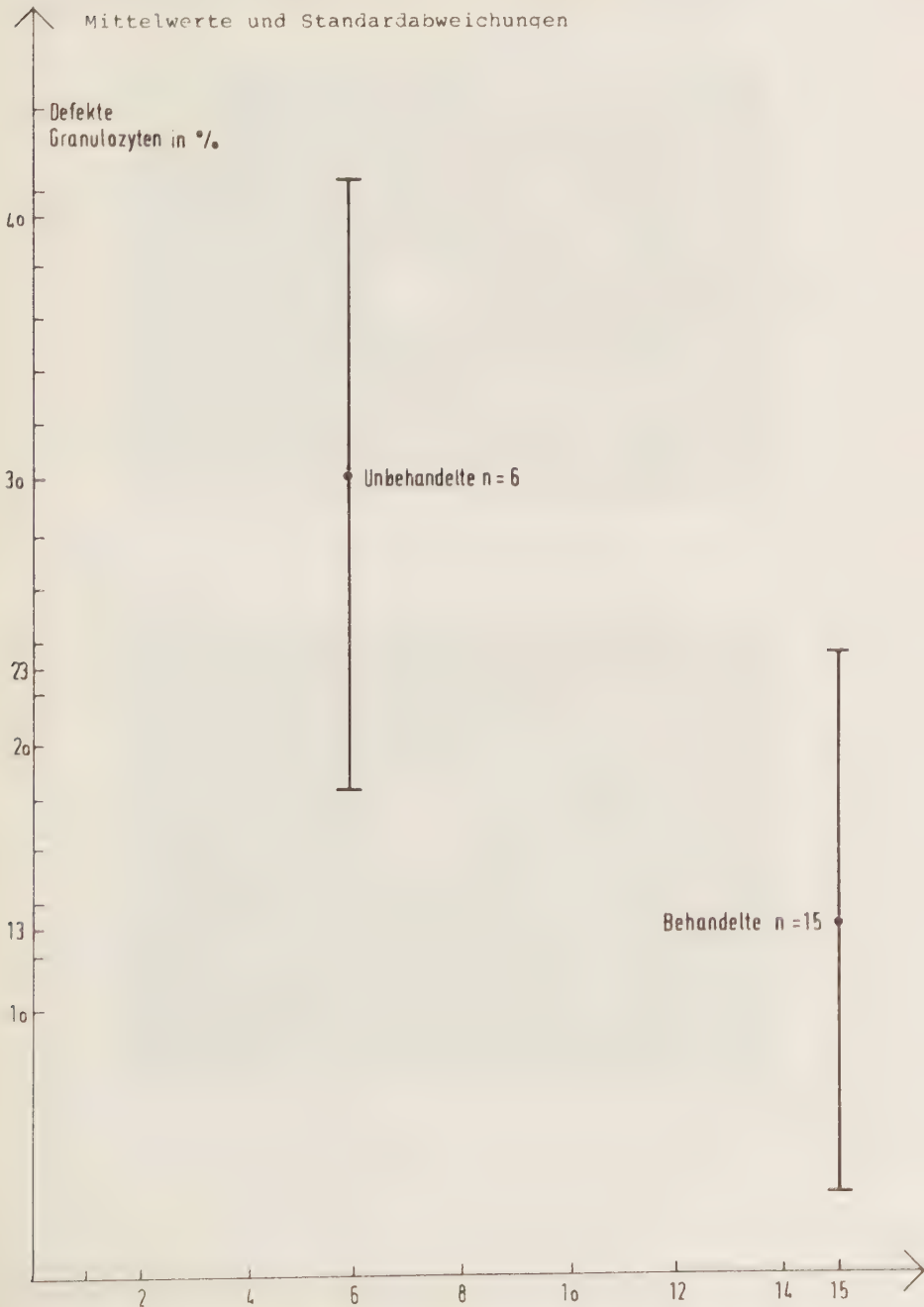
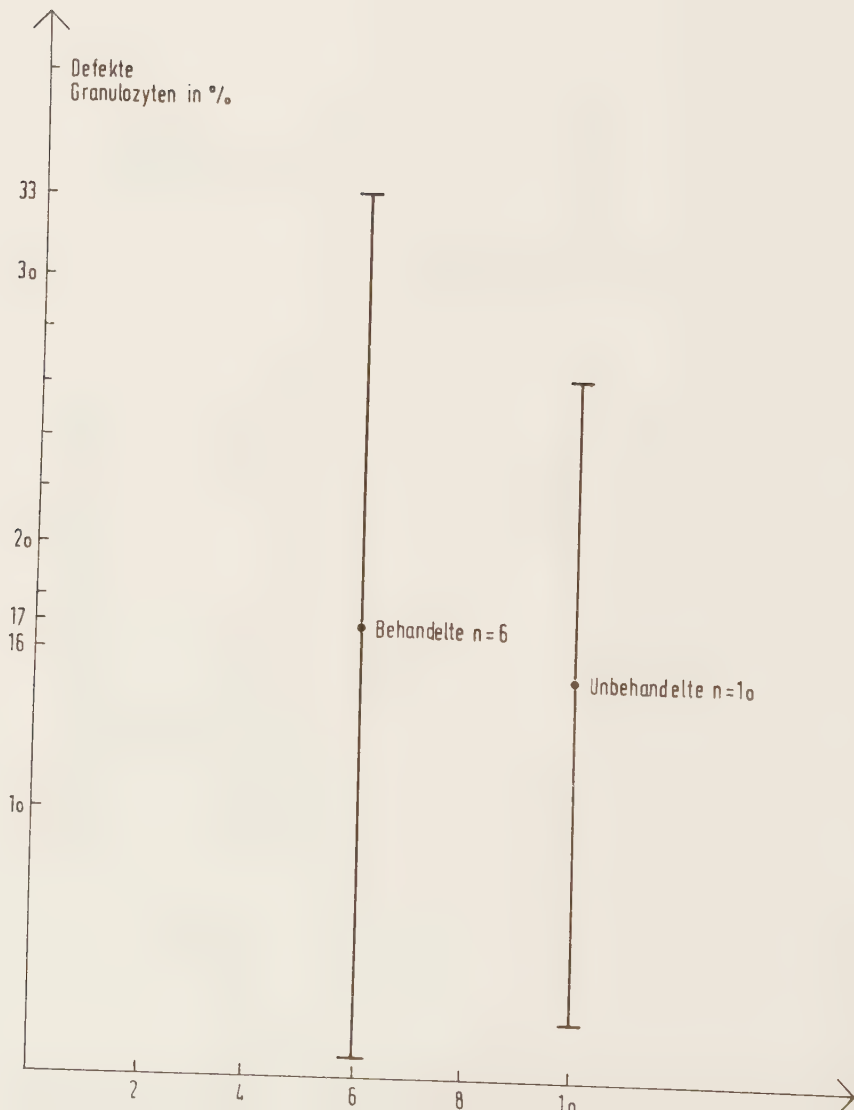


Abb. 4: Prozentualer Anteil defekter Granulozyten bei Behandelten und Unbehandelten mit anderen Entzündlichen Erkrankungen. Mittelwerte und Standardabweichungen



3.5. Bildmaterial

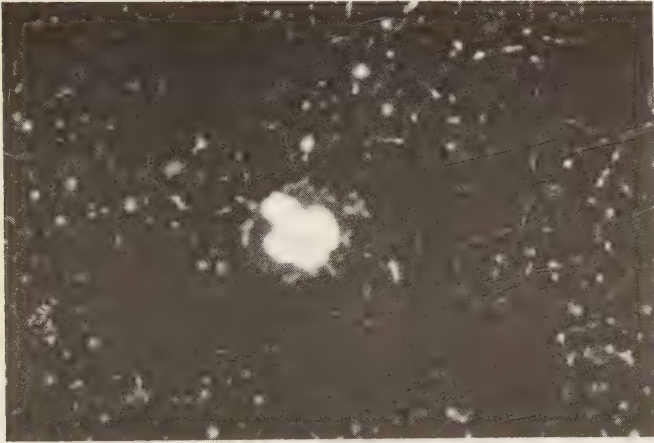


Abb. 5: Vitaler Granulozyt mit Heparinanlagerung
an die Zellmembran

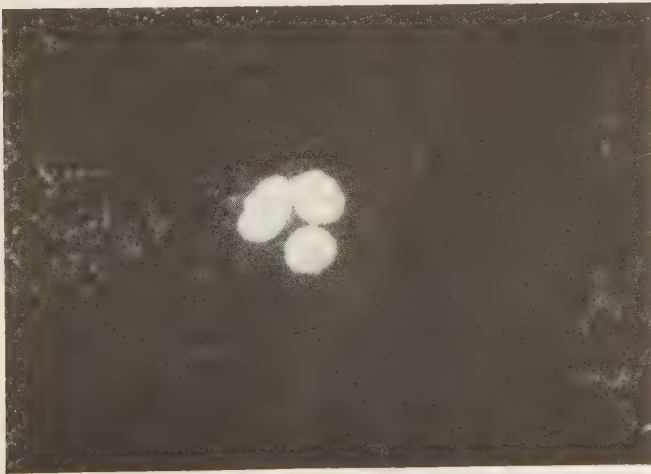


Abb. 6: Devitalisierter Granulozyt, keine Heparinanlagerung
an die Zellmembran

III. DISKUSSION

Der menschliche Organismus verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen, die in unspezifischer Form, z.B. als Entzündung oder in spezifischer Form als Immunität auftreten. Beide Systeme sind über Mittlermechanismen gekoppelt. Die Immunität besitzt geringe direkte Effizienz, aber höchste Spezifität, bei der unspezifischen Abwehr verhält es sich umgekehrt.

Die Entzündung ist die Summe aller biochemischen und strukturellen Veränderungen, die einer Läsion folgen mit den 5 Kardinalsymptomen Calor, Rubor, Tumor, Dolor und Functio laesa (7, 27).

Die pathobiochemischen Mechanismen bei chronisch entzündlichen Gelenkserkrankungen lassen sich in 4 Schritte unterteilen:

1. Primäre Aktivierung des Bindegewebes durch meist unbekannte Mechanismen, die zur Synovitis führen
2. Immunchemische Reaktionen, die den entzündlichen Prozeß unterhalten und verstärken.
3. Destruktion der interzellulären Matrixbestandteile (Proteoglykane, Hyaluronat, Kollagen, strukturelle Glykoproteine) vorwiegend durch hydrolytische Enzyme und O_2 -entstammende Radikale.
4. Reporative Stoffwechselprozesse von Synovialzellen und Chondrozyten, um durch Neusynthese der Matrixbestandteile deren Verlust auszugleichen.

Entzündliche Gelenkprozesse sind primär in der Synovialmembran und in der Synovialflüssigkeit lokalisiert und dehnen sich erst sekundär auf den Gelenkknorpel aus. Im Mittelpunkt steht hier der Phagozyt (Granulozyten, Makrophagen), d.h.

die Phagozytose und ihre Konsequenzen für die Struktur der Bindegewebskomponenten. Vor allem während der Phagozytose von Immunkomplexen und Zelltrümmern werden aktiv Mediatoren der Entzündung sezerniert, wie lysosomale Enzyme, Superoxidradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid. Den neutralen Proteasen Elastase und Kathepsin G aus neutrophilen Granulozyten kommt eine zentrale Bedeutung bei dem Abbau der Proteoglykanmonomere zu.

Substrate für Granulozyten-Elastase sind: Elastin, Proteoglykane, Kollagen III, Fibronectin, IgG, C3, Faktor XIII und AT III.

In zahlreichen Studien wurde versucht, diese komplexen Mechanismen aufzuklären und den einzelnen Komponenten ihre Bedeutung zuzuordnen:

S e d l a c k (28) fand, daß es bei der Bindung von Immunkomplexen an FC-Rezeptoren von Granulozyten zu einer Exozytose lysosomaler Enzyme kommt, ohne daß die Zelle zerstört wird. Die vor allem bei Granulozytenschädigung freigesetzte Elastase trägt wesentlich zur Gewebsdestruktion bei (12, 13, 14, 17, 18, 20, 23).

Entkommen lysosomale Enzyme im Verlauf einer Entzündung in das extrazelluläre Milieu, so können sie die Entzündungsantwort des Organismus auf 2 Arten verstärken:

1. Durch selektive Proteolyse werden Proenzyme in Co-Faktoren aktiviert sowie biologisch hochaktive Polypeptide wie Kinine und Anaphylatoxine gebildet, die aktiven Enzyme werden dann durch spezifische Interaktionen mit ihren natürlichen Inhibitoren gehemmt und als inaktive Enzym-Inhibitor-Komplexe eliminiert. Diesen Vorgängen liegen Reaktionsmechanismen von hoher Selektivität zugrunde, so daß man von einem spezifischen Verbrauch der Faktoren der Gerinnungs-, Fibrinolyse-,

Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systeme sprechen kann.

2. Durch unspezifische Proteolyse, d.h. durch einfache Verdauung, werden lösliche Faktoren (z.B. Antithrombin III) oder Strukturproteine inaktiviert bzw. zerstört (12, 15, 19, 25).

D i n g l e (2) fand, daß Phagozyten eine große Zahl von Lysosomen enthalten, welche ein hohes Potential an hydrolytischen und proteolytischen Enzymen besitzen.

An der Freisetzung lysosomaler Enzyme aus Makrophagen und Granulozyten sind wesentlich Immunkomplexe beteiligt (26).

Verschiedene Stimuli können den alternativen Weg initiieren, aber der klassische Weg, der durch Immunkomplexe eingeleitet wird, ist für die rheumatische Entzündung bedeutender (8).

Oxidierende Agentien wie Superoxidanionenradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid mit Myeloperoxidase werden in großer Menge in den Phagolysosomen produziert, um dort den Abbau von phagozytiertem Material einschließlich invasiver Organismen zu forcieren. Die Sauerstoffradikale werden mit den lysosomalen Enzymen wahrscheinlich extrazellulär wirksam (16).

W e i s s m a n n (33) und G o l d b e r g (5) beschrieben die Regulation der aktiven Sekretion des Phagozyten, in welche zyklische Nukleotide einbezogen sind, und zwar derart, daß durch den Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem AMP die Abgabe gehemmt, von zyklischem CMP gesteigert wird.

Die Freisetzung inflammatorischer Medien soll durch Prostaglandine moduliert werden, und zwar über die Aktivierung zyklischer Nukleotide, wobei Prostaglandin E₂ die Bildung

von zyklischem AMP, und Prostaglandin F2a die Bildung von zyklischem GMP stimulieren soll, so daß beide Prostaglandintypen antagonistisch wirksam wären (4).

Die Degranulierung von Neutrophilen und erhöhte Chemotaxis ist durch C5a bedingt, ebenso die Superoxid-Anion (O_2^-) Freisetzung, Ödeme und Permeabilitätserhöhung der Gefäße (32).

Die bei der Entzündungsantwort initiierten Reparationsmechanismen stellen offensichtlich ein sehr komplexes Geschehen mit den vielfältigsten Beziehungen zwischen den verschiedensten Systemen des Organismus dar (Gerinnung, Fibrinolyse, Komplement-, Kallikrein-Kininsystem) (29).

Einer der Wirkungsmechanismen der nicht-steroidalen Antiphlogistika ist die Prostaglandinsynthetase-Hemmung. Voraussetzung zur Phagozytose von Immunkomplexen ist u.a. die Ca-Konzentration auf der Innenseite der Phagozytenmembran. Dies wird durch einen Pumpmechanismus in der Zelle bewirkt (11).

Die nicht-steroidalen Antiphlogistika (Indometacin, Ibuprofen, Piroxicam) sollen als Ca-Kanal-Blocker wirken und dadurch die zur Phagozytose notwendige Verringerung der Ca-Konzentration an der Innenseite der Phagozyten verhindern (3).

Die Granulozyten können durch 3 Mechanismen zur Ausschüttung des Granula-Inhalts stimuliert werden, ohne daß die Zelle selber dabei geschädigt wird:



Abb.7: Mechanismen zur Granula-Ausschüttung

Zu I: "Regurgitating during feeding", bei dem nach Phagozytose das Phagosom nicht völlig verschlossen ist.

Zu II: Die "frustrated phagocytosis" an opsonierten, nicht freßbaren Oberflächen.

Zu III: Unmittelbare Enzymfreisetzung durch Einwirken von C5a (6).

Durch die Vitalfärbung können phagozytierende Granulozyten als geschädigt bzw. devitalisiert erkannt werden, was eine Freisetzung lysosomaler Enzyme und das Auftreten aggressiver Sauerstoffprodukte zur Folge hat. Die Zellschädigung, die durch Komplementkomponenten aktiviert wurde, führt zum Freiwerden hydrolytischer Enzyme und zur Anhäufung von Prostaglandinen als Entzündungsmediatoren (24, 26, 32).

Obwohl ein devitalisierter Granulozyt als Indikator zur Freisetzung lysosomaler Enzyme dient, kommt es auch ohne Zellmembranschädigung zu einer Freisetzung dieser Enzyme (10, 22).

M i e l k e (21) untersuchte 2 - 3 Jahre alle 6 Monate 51 Patienten mit Rheumatoider Arthritis und verglich klinischen Zustand mit Laborparameter: BKS korrelierten am besten, gefolgt von IgM, zirkulierenden Immunkomplexen, Hb, C3a und Fibrinogen.

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Methode, in der Kinderpoliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt, wurde die Unversehrtheit bzw. Schädigung von Zellmembranen bei Granulozyten beobachtet mit dem Ziel, eine Beziehung zwischen der Anzahl der defekten Granulozyten, der Krankheitsaktivität sowie den üblichen Krankheitsparametern herzustellen.

Die vorliegende Studie umfaßt 48 Patienten mit Entzündlicher Rheumatischer Erkrankung und 50 gesunde Probanden. Von den Erkrankten waren 29 Patienten medikamentös behandelt und 19 nicht behandelt.

Nach der dieser Arbeit zugrunde liegenden Methode können im Fluoreszenzmikroskop vitale Granulozyten von devitalisierten eindeutig differenziert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß bei devitalisierten Granulozyten Entzündungsmediatoren zur Wirkung kommen, die für die Krankheitsaktivität verantwortlich sind.

Bei der Gruppe der medikamentös behandelten Patienten wurden im Vergleich zur Gruppe der nicht behandelten Patienten im Mittel deutlich weniger defekte Granulozyten nachgewiesen. Ein membranstabilisierender Effekt der eingesetzten Medikamente kann somit angenommen werden.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Die Übergänge von den physiologischen Schwankungen der Leukozytenzahl zu pathologisch-reaktiven Veränderungen des weißen Blutbildes sind fließend. Akute bakterielle Infektionen führen zu charakteristischen Veränderungen der Blutzellen und der Serumproteine.

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Methode wurde die Unversehrtheit bzw. die Schädigung von Zellmembranen bei Granulozyten beobachtet.

Ziel dieser Studie ist es, eine Beziehung zwischen der Anzahl der defekten Granulozyten, der Krankheitsaktivität sowie den üblichen Entzündungsparametern herzustellen.

Bei 48 Patienten mit Entzündlicher Rheumatischer Erkrankung und bei 50 gesunden Probanden wurden folgende Blutparameter bestimmt: BKS, Leukozytenzahl, Anzahl der reifen, der unreifen sowie der defekten Granulozyten.

Für die Anzahl der defekten Granulozyten gilt: Ein Mittelwert von 5 liegt im Normbereich, Werte über 10 sind pathologisch. Vital ist ein Granulozyt, der fähig ist, Heparin an die Zellmembran anzulagern bzw. der, nach der dieser Arbeit zugrunde liegenden Methode, im Fluoreszenzmikroskop einen gelben Kern und ein grünes Plasma zeigt. Ein devitalisierter Granulozyt zeigt einen Fluoreszenzverlust von Kern und Plasma und keine Heparinanlagerung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen erkennen, daß bei devitalisierten Granulozyten Entzündungsmediatoren zur Wirkung kommen, die für die Krankheitsaktivität verantwortlich sind.

Bei einem Patientenquot von 48 Erkrankten zeigt die Gruppe der medikamentös behandelten Patienten im Vergleich zur Gruppe der nicht behandelten Patienten im Mittel deutlich weniger devitalisierte Granulozyten. Ein membranstabilisierender Effekt der eingesetzten Medikamente kann somit angenommen werden.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bühlmann A. A. 1972 Pathophysiologie, Springer
Froesch E. R. Verlag, S. 101 - 102

2. Dingle I. T. 1977 Lysosomes: A laboratory
e.a. handbook, North-Holland
Publ. Comp., Amsterdam, New
York, Oxford

3. Dunham P. 1983 Stimulus response coupling
Anderson C. in sponge cell aggregation:
e.a. evidence for calcium as an
intracellular messenger.
Proc. Nat. Acad. U.S.A. 80
S. 4756 - 4760

4. Dunn C. J. 1976 Biomedicine 24 S. 214
e.a.

5. Goldberg N. D. 1973 Pharmacology and the future
e.a. of man, Vol. 5, Cellular
mechanisms (Acheson GH,ed),
Karger, Basel S. 146

6. Goldstein I. M. 1976 Polymorphnuclear leucocyte
leposomes and immun tissue
injury. Prog. Allergy 20,
S. 301

7. Gross R. 1982 Lehrbuch der Inneren Medizin
Schölmerich P. 6. Aufl. Schattauer, S. 36,
S. 205

3. Hadding U. 1980 Possible Contribution of the Complement system to the Inflammatory state, In: Trends in Inflammation Research I. Agents and Actions, Suppl.7 (Velo, 6 P ed) Birkhäuser Verlag Basel S. 24 - 32
9. Hadorn W. 1979 Vom Symptom zur Diagnose
Zöllner N. 7. Aufl. Karger, Basel
S. 397 - 401
10. Henson P.M. 1971 Interaction of cells with immune complexes: Adherence release of constituent and tissue injury. I. exp. Med. 134, S. 104 - 118
11. Horn W. 1984 Neuere Theorien der Phagozytose u. methodische Probleme bei der Untersuchung v. Phagozytosedefekten bei Diabetikern. Immun-Infekt 12, S. 13 - 19
12. Janoff A. 1968 Mediators of inflammation
Scherer I. in leucocyte lysosomes. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leucocytes. I. ex. Med. 128, S. 1137 - 1151

13. Janoff A. 1975 At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissues. Ann. N.Y. Acad. Sci 256 S. 402 - 407
14. Janoff A. 1987 Granulocyte elastase: Role in arthritis and in pulmonary emphysema. In: K. Haveman, A. Janoff: Neutral proteases of human polymorphonuclear leucocytes, Urban u. Schwarzenberg Verlag Baltimore, Munich S. 309 - 316
15. Jochum M. 1981 Effect of human granulocytic elastase in isolated Landers S. human antithrombin III e.a. Z Physiol.Chem. 362, S. 103 - 112
16. Klebanoff S. J. 1978 The Neutrophil Function and clinical Disorders. Clark R. A. North-Holland, Publ.Comp. Amsterdam, N.Y. Oxford
17. Knöpfel M. 1981 Degradation in vivo of Articular Cartilage in Rheumatoid Arthritis by Leucocyte Elastase from Polymorphonuclear Leucocytes. e.a. Rheumatol.Int.1, S. 121 - 130

18. Lazarus G. S.
Daniels I. R.
e.a.
1986 Degradation of Collagen by human Granulocyte collagenolytic system. I. Clin. invest. 47 S. 2622 - 2627
19. Mainardi D.L.
e.a.
1980 Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leucocyte granules. In Biol. Chem. 255, S. 5435 - 5441
20. Menninger H.
Burkhardt H.
e.a.
1981 Lysosomal Elastase: Effect on Mechanical and Biochemical properties of Normal Cortilage. Inhibition by polysulfonated Glucosaminoglycans and Binding to Chondrocytes, Rheumatol. Int. 1. S. 73 - 81
21. Mielke H.
Deischer H.
1985 Correlation of Inflammatory RA Disease Activity with Laboratory Parameters. Scand.J. Rheumatology 14 S. 22 - 24
22. Olsson K.
1977 The intracellular release of granulocyte collagenase and elastase during phagocytosis and inflammatory process. Scand.J. Haematol. 19 S. 145 - 151

23. Oronsky A. L. 1978 Granulocyte neutral pro-
Buerrmann C. W. teases in arthritis. In:
K. Haveman, A. Janoff:
Neutralproteases of human
polymorphnuclear leucocytes.
Urban u. Schwarzenberg Verl.
Baltimore Munich S. 361 -
367
24. Rutherford B. 1983 C3 Cleavage Products Stimu-
Schenkein H. A. late Release of Prostaglan-
dines by Human Mononuclear
Phagocytes in Vitro. In:
Immunol.130 S. 874 - 877
25. Schmidt W. 1974 Effect of Elastase-like
e.a. and Chemotrypsin-like Neu-
tral Protease from Human
Granulocytes on Isolated
Clotting Factors. Thromb.
Res. 6, S. 312 - 326
26. Schorlemmer H. U. 1975 Ability of Activated Comp-
Davies P. H. plement Components to in-
Allison A. C. duce Lysosomal Encyme Re-
lease from Macrophages.
Nature 261 S. 48 - 49
27. Schubert G. E. 1981 Lehrbuch der Pathologie
Bethke B. A. De Gruyter Verlag
S. 245 - 246, S. 341

- | | |
|-----------------------------|---|
| 28. Sedlack H. H.
e.a. | 1983 Prophylaxe und Therapie mit Immunglobulinen: Eine kritische Stellungnahme zur Frage der immunkomplex-bedingter Entzündungsreaktionen Beitr. Infusions-Therapie Klin.Ernährung Vol. 11, S. 6 - 19
Karger Basel |
| 29. Somolken I. S.
e.a. | 1983 Cellular and Subcellular Mediators of Acute Inflammation. Clinics of N.America 63,S. 225 - 243 |
| 30. Steiger U.
Lämmle B. | 1985 Juvenile Chron. Arthritis-Still'sche Krankheit im Kindes- u. Erwachsenenalter. In: Deutsches Ärzteblatt, Aktuelle Medizin, Ausg.B, 82 Heft 4, S. 171 - 180 |
| 31. Truckenbrodt H. | 1984 Die Juvenile Chron.Arthritis und ihre Subgruppen, in MMW 126 Nr. 38, S. 1076 - 1078 |
| 32. Webster R. O.
e.a. | 1980 Biological Effect of the Human Complement Fragments C5a and C5a des Arg on Neutrophil Function Immunopharmacology 2, S. 201-229 |
| 33. Weissmann G.
e.a. | 1971 Nature (New Biol.) 231, S. 131 |

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Suschke danke ich für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. med. K. Überla und seinen Mitarbeitern vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik danke ich für die Beratung und die Erlaubnis zur Computerbenutzung.

Herrn Dr. Wilde, Leiter des Instituts für Statistik am Zentralklinikum Augsburg, danke ich für seine freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meiner Schwester, Frau M. Kuszlik-Szuper, danke ich für die Eingabe meiner Arbeit in den Schreibcomputer.

Herrn Dipl.-Ing. F. J. Balmert danke ich für die freundliche Hilfestellung bei der Zeichnung der Abbildungen.

LEBENS LAUF

Am 26. Februar 1957 wurde ich als viertes Kind des technischen Angestellten Daniel Kuszlik und seiner Ehefrau Magdalena, geborene Styranec, in Lingen/Ems geboren.

Von 1963 an besuchte ich die Volksschule in Essen. Im Jahre 1968 wechselte ich auf das sozialwissenschaftliche Bertold-Brecht-Gymnasium in München über, wo ich am 24. Juni 1977 das Abitur ablegte.

An der Ludwig-Maximilians-Universität in München immatrikulierte ich mich im Wintersemester 1978/79 für das Fach Physik.

Im Sommersemester 1980 schrieb ich mich an der Freien Universität Berlin für das Studium der Humanmedizin ein. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich am 23. März 1982, danach wechselte ich zum ersten klinischen Semester (SS 1982) nach München an die Ludwig-Maximilians-Universität. Den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich am 24. März 1983 ab, den zweiten Abschnitt am 22. März 1985. Im Praktischen Jahr absolvierte ich das erste Tertial (Chirurgie) im Zentralklinikum Augsburg, das zweite Tertial (Wahlfach Radiologie) in der Radiologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum München-Großhadern und das dritte Tertial (Innere Medizin) im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching.

Am 22. Januar 1986 wurde mein Sohn Alexander Maxim geboren.

